

# **Alfa-pineenin määrittäminen biosuodatin- koelaitteistossa: menetelmäkehitys**

Matti Haaponiemi

Opinnäytetyö  
Tammikuu 2013  
Laboratorioalan koulutusoh-  
jelma

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma

MATTI HAAPONIEMI:

Alfa-pineenin määrittäminen biosuodatinkoelaitteistossa: menetelmäkehitys

Opinnäytetyö 43 sivua, joista liitteitä 3 sivua  
Tammikuu 2013

---

Kuivakäymälöistä aiheutuu hajuhaittoja, sillä käymäläjätettä ei johdeta viemäriverkostoon, vaan sitä varastoidaan väliaikaisesti käymälän yhteyteen. Käymäläjätteen epämiellyttävä haju aiheutuu monista eri yhdisteistä, joista suurimpana yksittäisenä komponenttina on ammoniakki.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tampereen teknillisellä yliopistolla Bio- ja ympäristötekniikan laboratoriossa Dry Closet –tutkimusryhmässä, jossa tutkittiin hajuhaittojen vähentämistä ilmasta biosuodatuksella. Tutkimuksessa seurattiin erityisesti biosuodattimen ammoniakin poistotehokkuutta. Koska käymäläjätteestä haihtuu paljon muitakin hajuhaittoja aiheuttavia yhdisteitä, haluttiin selvittää ja kehittää menetelmä muiden haihtuvien orgaanisten yhdisteiden määrittämiseksi biosuodatinlaitteistosta.

Tutkittavaksi yhdisteeksi valittiin alfa-pineeni, koska sen biosuodatuksesta on julkaistu useita tutkimusartikkeleita. Alfa-pineeni on terpeeni, jota esiintyy muun muassa vihanneksissa ja täten myös käymäläjätteessä.

Menetelmän kehitys aloitettiin esikäsittelymenetelmän valinnalla. Vartenotettavina vaihtoehtoina pidettiin sorbenttiputkia sekä kiinteäfaasimikrouutto-kuituja (SPME, Solid Phase Microextraction). Esikokeet osoittivat kuitujen soveltuvan paremmin koelaitteistolle. Analyysilaitteena käytettiin liekki-ionisaatiodektektorilla varustettua kapillaari-kaasukromatografiaa.

Opinnäytetyössä kehitettiin alustava menetelmä alfa-pineenin määrittämiseksi kaasukromatografilla ja Carboxen/polydimetyylisiloksaani SPME-kuiduilla biosuodatinlaitteistosta mutta menetelmä kaipaa vielä lisäkehitystä ollakseen validoimiskelpoinen.

---

Asiasanat: menetelmäkehitys, spme, kaasukromatografia, biosuodatus, alfa-pineeni

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Science

MATTI HAAPONIEMI:

Quantification of alpha-pinene in biofilter application: Method development

Bachelor's thesis 43 pages, appendices 3 pages  
January 2013

---

Bad odors can be a problem in the vicinity of dry toilets since the human waste is stored temporarily in the toilets. The unpleasant odor of human waste is a combination of many different volatile organic compounds with ammonia being the major component.

This bachelor's thesis was made in Tampere University of technology in the Environmental Engineering and Biotechnology laboratory as a part of Dry Closet project. One of the project's aims was to research the removal of bad odors, especially ammonia, from air with a biofilter application. Since there are many other volatile organic compounds causing the unpleasant odors than ammonia, there was a need for a new method to develop.

Alpha-pinene was chosen as an analyte because there were many articles published of its' biofiltration. Alpha-pinene is a terpene which occurs naturally in vegetables for example and therefore in human excrement.

The method development was started by choosing a sample preparation technique. The choice was made between active charcoal adsorbent tubes and solid phase microextraction fibers. Preliminary tests showed that the SPME fibers were more suitable for the biofilter equipment. A capillary gas chromatograph combined with a flame ionization detector was used for the analysis.

A preliminary method for quantification of alpha-pinene in a biofilter application using Carboxen/polydimethylsiloxane SPME fibers was developed but the method still needs further development and validation.

---

Key words: method development, spme, gas chromatography, biofiltration, alpha-pinene

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEOREETTINEN TAUSTA .....	8
2.1	Haihtuvat orgaaniset yhdisteet.....	8
2.1.1	Haihtuvat orgaaniset yhdisteet kuivakäymälässä.....	8
2.1.2	Alfa-pineeni.....	9
2.2	Biosuodatin .....	9
2.3	Sorbenttiputket.....	10
2.4	Kiinteäfaasimikrouutto .....	11
2.4.1	Toimintaperiaate .....	11
2.4.2	Näytteenottomekanismit .....	12
2.4.3	Epätasapainouuton mallinnus.....	15
2.5	Kapillaarikaasukromatografia.....	16
2.5.1	Periaate yleisesti.....	17
2.5.2	Suorainjektio .....	18
2.5.3	Jakoinjektio .....	18
2.5.4	Kolonnit .....	19
2.5.5	Liekki-ionisaatiodetektorit .....	20
3	TYÖN TAVOITTEET .....	21
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	22
4.1	Esikokeet.....	22
4.2	Kromatografia .....	22
4.3	Standardit .....	22
4.4	Koelaitteisto .....	23
4.5	Näytteenotto.....	25
4.6	Menetelmän arviointi.....	26
4.6.1	Lineaarisuus .....	27
4.6.2	Keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta.....	27
4.6.3	Toteamis- ja määrittäysraja.....	28
5	TULOKSET .....	29
5.1	Menetelmän kehittäminen.....	29
5.1.1	Standardisuoran lineaarisuus.....	31
5.1.2	Näytteenotto ja lineaarisuus .....	33
5.1.3	Lämpötila ja suhteellinen kosteus .....	35
6	POHDINTA.....	37
	LÄHTEET.....	39
	LIITTEET .....	41

Liite 1. Alfa-pineenistandardien valmistusohje.....	41
Liite 2. Näytteenotto-ohje.....	42
Liite 3. Näytteidenajo-ohje.....	43

## 1 JOHDANTO

Alfa-pineeni on erityisesti mäntypuissa esiintyvä yhdiste. Sitä on myös monissa vihanneksissa kuten porkkanassa. Alfa-pineeniä esiintyy täten myös ihmisten ulosteessa. Yhdiste tuoksuu lähinnä puulta, mutta sekoittuessaan muiden ulosteessa olevien voimakkaasti tuoksuvien yhdisteiden kanssa, se saatetaan kokea epämiellyttäväksi. Alfa-pineenin biosuodatusta on tutkittu paljon mutta eri viitekehyksessä, kuin tässä työssä, kuten saha- ja kompostointilaitoksien ilmansuodatuksessa.

Työn tavoitteena oli selvittää soveltuva menetelmä alfa-pineenin mittaamiseksi biosuodatinkoelaitteistosta ja toteuttaa se. Työn tarkoituksena oli tutkia biosuodattimen suodatustehokkuutta sekä luoda pohjaa uusien menetelmien kehittämiseksi hajuhaittoja aiheuttavien yhdisteiden määrittämiseksi biosuodatusjärjestelmissä. Tutkimuksesta on hyötyä aloilla ja laitoksissa, missä hajuhaitat saattavat muodostaa ongelmia tai jopa terveyshaittoja. Kirjallisten selvitysten ja muutamien esikokeiden perusteella esikäsittelymenetelmäksi valittiin kiinteäfaasimikrouuttotekniikka ja analyysilaitteeksi liekki-ionisaatiodektoirilla varustettu kapillaarikaasukromatografi.

Kiinteäfaasimikrouuttotekniikka (SPME, Solid Phase Microextraction) on liuotinvapaa näytteenottomenetelmä, jossa yhdistyy näytteenotto, uutto ja konsentrointi samaan työvaiheeseen. Kiinteäfaasimikrouuttotekniikassa ohueen pinnoitettuun silikakuituun kiinnittyy näytematriisin molekyylejä. Se, mitä molekyylejä kuituun sitoutuu, riippuu pinnoitteen materiaalista. Kuitu paljastetaan injektioruiskua muistuttavan laitteen neulasta ennalta määritellyksi ajaksi ja kuitu vedetään tämän jälkeen takaisin neulaan. Kuituun tarttuneet analyytit analysoidaan kapillaarikaasukromatografilla, jonka injektioportissa analyytit desorptoituvat lämmön vaikutuksesta ja etenevät kolonniin, erottuvat, ja päätyvät lopulta detektorille.

Työ tehtiin Tampereen teknillisen yliopiston Bio- ja ympäristötekniikan laboratoriossa Dry Closet –projektissa, jossa tutkittiin muun muassa kuivakäymälöiden hajunpoistoa biosuodatuksella. Tutkimus sai rahoitusta Euroopan unionin Seitsemänneltä puiteohjelmalta, jota johti REA-Research Executive Agency <http://ec.europa.eu/research/rea>

([FP7/2007-2013][FP7/2007-2011]) apurahasopimuksen numero [256295] mukaisesti. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat tutkijatohtori Marja Palmroth sekä opettajaohjaaja Outi Heiniö.

## 2 TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Haihtuvat orgaaniset yhdisteet

Haihtuville orgaanisille yhdisteille (VOC, Volatile Organic Compounds) on useita määritelmiä. Esimerkiksi EU määrittelee ne orgaanisiksi yhdisteiksi, joiden höyrynpaine 293,15 K lämpötilassa on 0,01 kPa tai enemmän, tai vastaava haihtuvuus tietyissä käyttöolosuhteissa (The Council of the European Union 1999).

Toisin sanoen VOC-yhdisteillä tarkoitetaan orgaanisia yhdisteitä, joiden höyrynpaine on huoneenlämmössä korkea ja siten niiden kiehumispiste on suhteellisen matala. Tämän vuoksi yhdisteitä haihtuu ilmaan merkittäviä määriä. VOC-yhdisteitä on valtava määrä ja esimerkiksi monet tuoksut ovat VOC-yhdisteitä.

#### 2.1.1 Haihtuvat orgaaniset yhdisteet kuivakäymälässä

Virtsan tuoksu on monen haihtuvan orgaanisen yhdisteen sekoitus, joka riippuu henkilön ruokavaliosta, juodun veden määrästä, terveydentilasta, liikunnasta sekä näytteenoton ajankohdasta. Suurin yksittäinen komponentti on ammoniakki, jonka pitoisuus kasvaa säilötyssä virtsassa ureolyysin vaikutuksesta. (Goosse 2009.)

Kuten virtsan, myös ulosteen tuoksu on monen haihtuvan orgaanisen yhdisteen summa, joka riippuu muun muassa ruokavaliosta sekä suolistobakteerien toiminnasta. Garner ynnä muut löysivät 297 eri VOC-yhdistettä tutkiessaan terveiden ja sairaiden ihmisten ulosteita. Ulosteista haihtui muun muassa alkaaneja, alkeeneja, aldehydejä ja ketoneita, terpeeneitä ja rikin yhdisteitä kuten vetysulfidia, metyylimerkaptania sekä dimetyyli-sulfidia. ( Garner, Smith, Lacy Costello, White, Spencer, Probert & Ratcliffe 2007; Tangerman 2009.)



### 2.1.2 Alfa-pineeni

Alfa-pineeni kuuluu terpeeneihin (kuva 1). Sitä esiintyy runsaasti mäntypuissa ja kahta enantiomeerejä esiintyy luonnossa. (Liu 2005, 60.) Alfa-pineenin kemiallinen kaava on  $C_{10}H_{16}$ . Sen moolimassa on 136,23 g/mol, tiheys on 0,854 g/ml, kiehumispiste on 156,3 °C ja se on käytännössä liukenematon veteen. (Haynes 2013, 3-460, 5-184).



KUVA 1. Alfa-pineenin rakenne. Vasemmalla (+)-alfa-pineeni ja oikealla (-)-alfa-pineeni (Liu 2005, 61, muokattu)

Ulosteen alfa-pineeni on peräisin vihanneksista kuten porkkanoista (Garner ym. 2007). Alfa-pineenin ja muiden terpeenien tuoksu on yleensä miellyttävä. Sekoittuessaan muiden käymälän hajujen kanssa terpeenien tuoksu saatetaan aistia epämiellyttäväksi. (Müller, Thissen, Braun, Dott & Fichert 2004.)

## 2.2 Biosuodatin

Biosuodatuksen tavoite on vähentää haitta-aineiden määrää suodattimen läpi virtaavasta fluidista. Biosuodattimien toimintamekanismit ovat monimutkaisia. Biosuodatin sisältää huokoista väliainetta, jonka pinta on veden ja mikro-organismien peittämää. Puhdistus tapahtuu haitta-aineiden siirtyessä kaasufaasista vesifaasiin, missä nämä muodostavat komplekseja orgaanisten yhdisteiden kanssa. Nämä puolestaan voivat adsorboitua biofilmiin tai väliaineeseen. Prosessissa yhdisteet muuntuvat mikrobien aineenvaihduntatuotteiksi. Biohajottaminen tapahtuu monimutkaisessa hajottajien, kilpailijoiden ja saalistajien ekosysteemissä, joka on ainakin osittain asettunut biofilmille. (Devanny, Deshusses & Webster 1999, 23.)

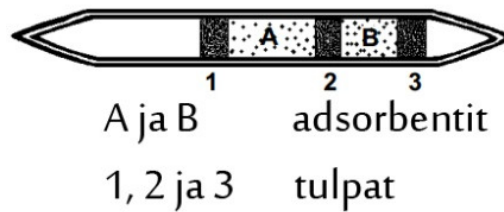
Tyypillisessä biosuodatinasennuksessa kontaminoitunutta ilmaa puhalletaan suodattimeen. Ennen suodatinta ilma johdetaan kostutuskammion lävitse ilman kyllästämiseksi vesihöyryllä, sillä suuri ilmankosteus parantaa biohajotusta. Kostutettu ilma johdetaan sitten suodattimen lävitse (Kennes & Veiga 2001, 48). Jos väliaine ei ole kosteaa, haitta-aineet eivät siirry vesifaasiin, eivätkä näin ollen ole mikrobien käytettävissä eikä biologista hajotusta tapahdu.

Koska alfa-pineeni on hydrofobista, kosteus heikentää suodattimen alfa-pineenin poistotehokkuutta (Rupar-Gadd, Bagherbour, Holmstedt, Welander & Sanati 2006). Sopivat olosuhteet ovat kompromissi eri haitta-aineiden poistotehokkuuksien välillä.

### **2.3 Sorbenttiputket**

Sorbenttiputkiin otetaan näytteitä ilmasta. Putkien sisällä on adsorbenttimateriaalia, johon adsorboituu kaasufaasissa olevia yhdisteitä. Adsorbenttimateriaaleja on erilaisia ja materiaali valitaan käyttökohteen mukaan. Käytetyin adsorbentti on aktiivihiili. Muita materiaaleja ovat muun muassa silikageeli ja Anasorb 747. Toisinaan käytetään myös kemialliseen reaktioon perustuvia sorbenttiputkia, kun esimerkiksi halutaan muodostaa vakaampi tai helpommin analysoitava yhdiste. (Harper 2000.)

Näytteenotto tapahtuu liittämällä sorbenttiputki kalibroituun pumppuun, jolla imetään vakiotilavuusvirralla ilmaa putken läpi. Sorbenttiputki voi olla lasia tai metallia ja sen sisällä on varsinainen adsorbenttikerros sekä varakerros, jotka on erotettu toisistaan ilmaaläpäisevillä tulpilla (kuva 2). Varakerroksen tehtävä on osoittaa varsinaisen adsorbenttikerroksen saturaatio. Mikäli varakerroksesta löytyy analyysivaiheessa analyytteja, primäärikerros on mahdollisesti saturoitunut tai jokin toinen kemikaali on syrjäyttänyt ne. Näyte on sitä vähemmän edustava, mitä enemmän varakerroksessa on analyytteja. Adsorbenttiin sitoutuneet analyytit saadaan desorptoitua adsorbenttimateriaalista riippuen joko liuottimella tai lämmön avulla. Yleisin liuotin on rikkihiili. (Harper 2000.)



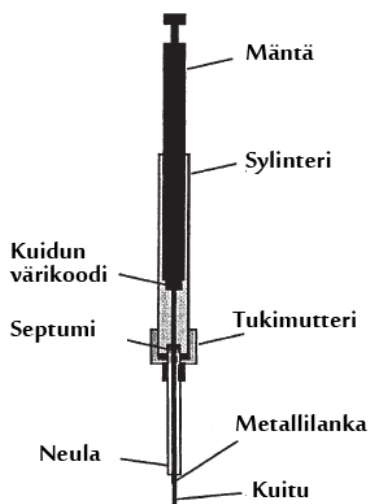
KUVA 2. Kaaviokuva adsorbenttiputkesta (Supelco 1998, muokattu)

## 2.4 Kiinteäfaasimikrouutto

Kiinteäfaasimikrouutto (SPME, Solid Phase MicroExtraction) on liuotinvapaa esikäsitelymenetelmä, joka yhdistää näytteenoton, uuton ja konsentroinnin yhteen työvaiheeseen (Zhang, Yang & Pawliszyn 1994.)

### 2.4.1 Toimintaperiaate

Kiinteäfaasimikrouuttotekniikassa hyödynnetään lyhyttä, ohutta, ja kiinteää silikasauvaa, joka on pinnoitettu adsorbenttipolymeerillä. Sauva eli kuitu on samankaltaista inerttiä materiaalia kuin kapillaarikaasukromatografian kolonnit ja se kestää hyvin korkeita lämpötiloja. Pinnoitettu kuitu on kiinnitetty metallilankaan ja tämä kokonaisuus on asennettu metallineulan sisään. Kokonaisuutena järjestelmä muistuttaa suuresti mäntäruiskua (kuva 3). (Scheppers Wercinski & Pawliszyn 1999, 1-2.)



KUVA 3. Kaaviokuva kiinteäfaasimikrouutto -laitteesta. (Scheppers Wercinski & Pawliszyn 1999, muokattu)

Kiinteäfaasimikrouuttotekniikka koostuu kahdesta prosessista. Ensimmäisessä analyytit jakautuvat näytteen ja pinnoitetun kuidun välillä. Toisessa prosessissa konsentroituneet analyytit desorptoituvat kuidusta analyysilaitteeseen. Kuidulla voidaan ottaa näytteitä liuoksesta, kiinteästä aineesta tai ilmatilasta. (Scheppers Wercinski & Pawliszyn 1999, 2.)

Näytteenotossa SPME-laitteen mäntä painetaan alas, jolloin neula tulee esiin lävistäen septumin. Kuitu saadaan esiin painamalla männän sisällä olevaa toista mäntää, joka on kiinnitetty metallilankaan. Paljastettu kuitu voidaan upottaa suoraan nestemäiseen näytteeseen tai altistaa ilmatilalle, jolloin analyytit uuttuvat näyttematriisista kuituun. (Scheppers Wercinski & Pawliszyn 1999, 2.) Käytännössä kuitu toimii ikään kuin nurinperin käännetty kolonni.

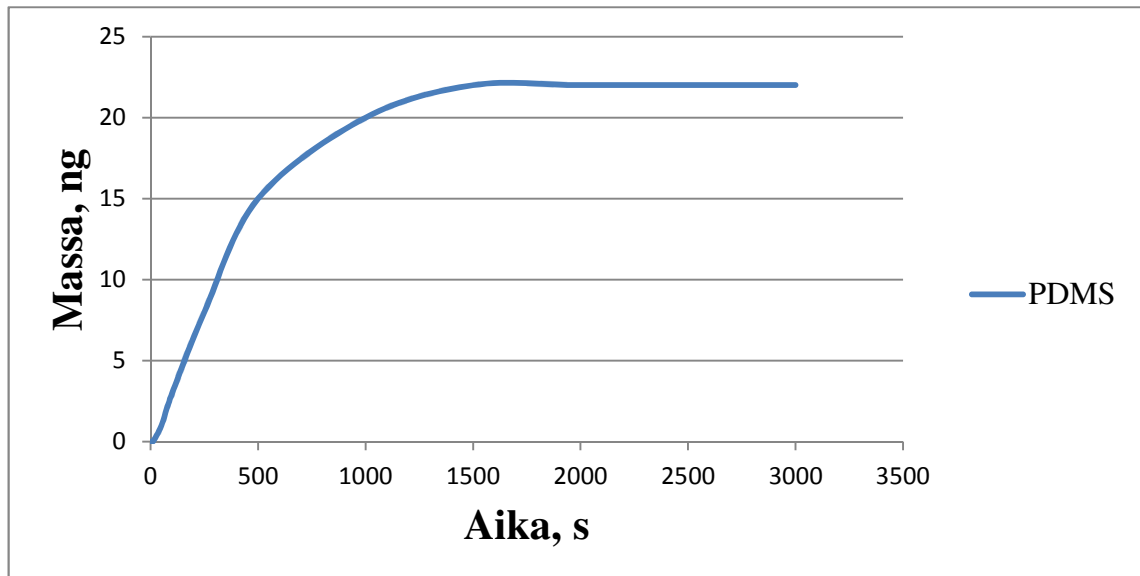
Ennalta päätetyn absorptioajan päätteeksi kuitu vedetään takaisin neulaan ja mäntä nostetaan ylös. Tämän jälkeen neula laitetaan kaasukromatografian injektioporttiin, ja kuitu paljastetaan. Injektorissa kuituun kohdistuu korkea lämpötila, jolloin konsentroituneet analyytit desorptoituvat lämmön vaikutuksesta ja siirtyvät kaasuvirtauksen mukana kolonniin. Koska erilaiset sorbentit uuttavat erilaisia analyyttejä, on kehitetty useita erilaisia pinnoitteita kuten esimerkiksi polydimetyylisiloksaanipinnoite (PDMS), joka on nestemäinen sekä Carboxen/polydimetyylisiloksaanipinnoite (Carboxen/PDMS), joka on huokoinen ja kiinteä. (Scheppers Wercinski & Pawliszyn 1999, 2-3.)

Koska kuidut ovat tehokkaita sitomaan molekyyliä, pitää ne puhdistaa ennen näytteenottoa. Puhdistus tapahtuu, kuten analyysissä, asettamalla kuitu kaasukromatografian kuumaan injektioporttiin. Puhdistusaika ja -lämpötila riippuu kuidun pinnoitemateriaalista. Esimerkiksi Carboxen/PDMS kuitua tulee pitää 300 °C:ssa vähintään 30 min (Supelco 1997).

#### **2.4.2 Näytteenottomekanismit**

Tavallisesti käytettäessä PDMS-kuituja kiinteäfaasimikrouutto on tasapainotekniikka eikä näytteenotossa häviä analyyttejä merkittävästi. PDMS-kuitujen pinnoite on nestemäinen. Kun kuitu asetetaan suljettuun näytepulloon, muodostuu tasapaino kolmen faasin välille: (1) kuidun pinnoitteen, (2) ilmatilan ja (3) nesteen tai kiinteän aineen välille

(kuvio 1). Tällöin näytteenottoajan on oltava riittävän pitkä, jotta tasapainotila saavutetaan. (Scheppers Wercinski & Pawliszyn 1999, 4.) Tasapainotilassa uuttuneen analyytin massa ei enää kasva näytteenottoajan kasvaessa.



KUVIO 1. Esimerkki PDMS-kuidun toiminnasta: Kuituun uuttuneen analyytin massa ajan funktiona. (Scheppers Wercinski & Pawliszyn 1999, 9, muokattu)

Faasien välinen tasapaino voidaan esittää yhtälön 1 mukaisesti ja siitä voidaan johtaa yhtälöt headspace-tekniikan sekä suoraan nesteeseen upottamisen kvantitointiin.

$$C_0 V_s = C_h V_h + C_f V_f + C_s V_s \quad , \quad (1)$$

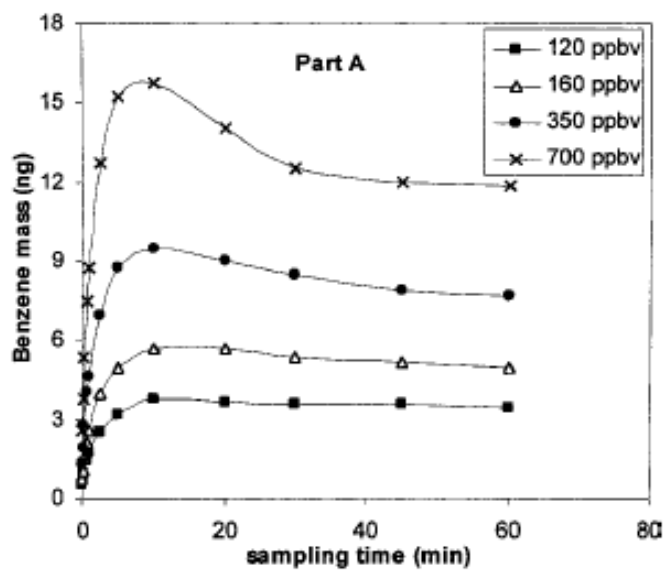
missä  $C_0$  on analyytin alkukonsentraatio liuoksessa,  $C_h$ ,  $C_f$  ja  $C_s$  ovat ilmatilan, kuidun ja liuoksen tasapainokonsentraatioita sekä  $V_h$ ,  $V_f$  ja  $V_s$  ovat ilmatilan, kuidun ja liuoksen tilavuuksia. (Scheppers Wercinski & Pawliszyn 1999, 5.)

Sekamateriaalikuiduilla voidaan käyttää myös epätasapaino-olosuhteissa. Polydimetyylisiloksaani/divinyylibentseeni (PDMS/DVB) ja Carboxen /polydimetyylisiloksaani (Carboxen/PDMS) pinnoitettuja kuituja voidaan käyttää epätasapaino-olosuhteissa VOC-yhdisteiden uuttamiseen ilmasta, kunhan näytteenottoaika pidetään riittävän lyhyenä. Näiden kuitujen pinnoite on kiinteä ja huokoinen. (Koziel, Jia & Pawliszyn 2000.)

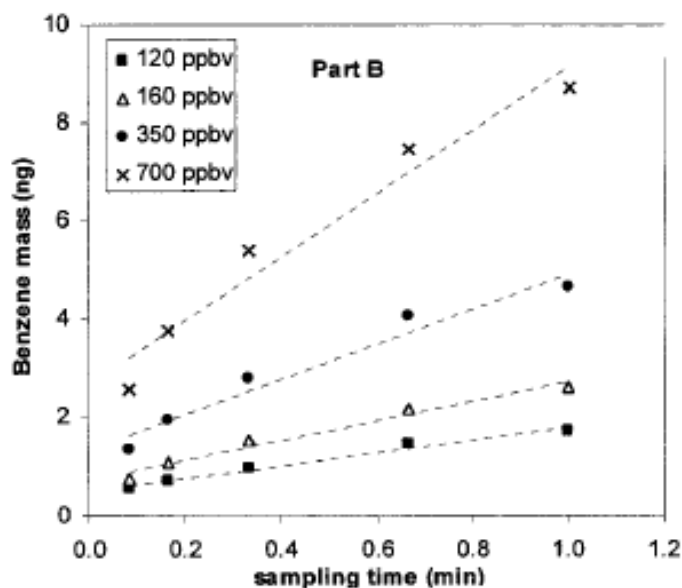
PDMS-kuitujen uutto perustuu absorptioon mutta sekamateriaalikuitujen uutto perustuu adsorptioon. Absorptioprosessissa ei ole kilpailua absorboituvien analyyttien välillä,

kun taas adsorptioprosessissa sen sijaan on. (Shirey & Mindrup 1999). Tämä tekee adsorptiolla toimivien kuitujen kalibroinnista ja kvantitoinnista haastavampaa. (Koziel, Ji & Pawliszyn 2000.)

Epätasapaino-olosuhteissa adsorptioprosessissa uuttuneen analyytin määrä kasvaa ensin lineaarisella nopeudella, kunnes adsorptionopeus hidastuu ja tasoittuu saavuttaessaan tasapainotilan (kuvio 1 & kuvio 2). Näytteenottoajan tulisi olla lineaarisella alueella. (Koziel, Jia & Pawliszyn 2000.)



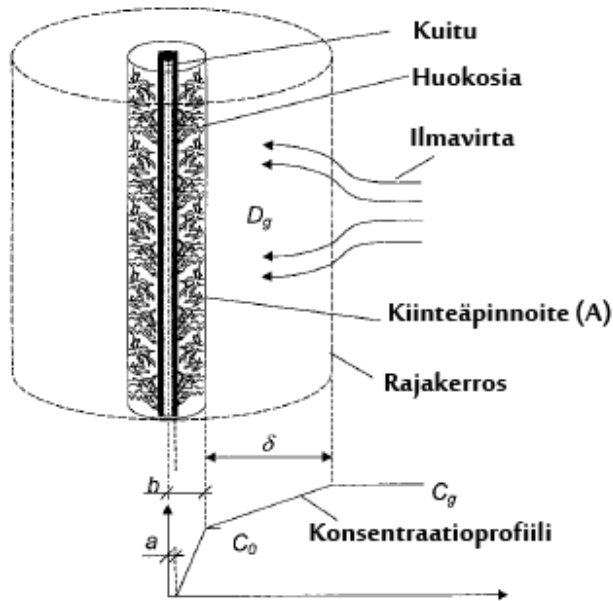
KUVIO 2. PDMS/DVB –kuidun sitoman bentseenin massa eri konsentraatioilla näytteenottoajan funktiona aikavälillä 0-60 min (Koziel, Jia, Pawliszyn 2000)



KUVIO 3. PDMS/DVB –kuidun sitoman bentseenin massa eri konsentraatioilla näytteenottoajan funktiona aikavälillä 0-1 min (Koziel, Jia, Pawliszyn 2000)

### 2.4.3 Epätasapainouuton mallinnus

Epätasapainoisissa olosuhteissa tapahtuvaa uuttoa on mallinnettu matemaattisesti ja testattu kokeellisesti. Kun kuitu paljastetaan ilmapirrille, muodostuu kuidun pinnan ympärille tietyn paksuinen rajakerros. Analyytit kulkevat ilmasta rajakerroksen läpi enimmäkseen diffuusiolla ja adsorboituvat kiinteän kuidun huokosiin (kuva 4). (Koziel, Jia & Pawliszyn 2000.)



KUVA 4. Kaaviokuva pikauutosta kiinteällä huokoisella SPME-kuidulla (Koziel, Jia, Pawliszyn 2000, muokattu)

Analyytin konsentraatiota voidaan tällöin arvioida yhtälöllä 2.

$$C_g = \frac{n \ln\left(\frac{b+\delta}{b}\right)}{2\pi D_g L t} \quad , \quad (2)$$

missä  $n$  on uutuneen analyytin massa (ng),  $b$  on kuidun ulkosäde (cm),  $\delta$  on rajakerroksen paksuus,  $D_g$  on molekulaarinen diffuusiokertoimen kaasufaasissa ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $L$  on kuidun pituus (cm) ja  $t$  on näytteenottoaika (s).

Uutuneen analyytin määrä voidaan arvioida nestemäisten injektioiden kromatogrammin piikeistä ja rajakerroksen paksuutta voidaan arvioida yhtälöllä (3).

$$\delta = 9,52 \frac{b}{Re^{0,62} Sc^{0,38}} , \quad (3)$$

missä  $Re$  on Reynoldsin luku  $= 2ub/v$ ,  $u$  on ilman lineaarinen nopeus (cm/s),  $v$  on ilman kinemaattinen viskositeetti ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) ja  $Sc$  on Schmidtin luku  $= v/D_g$ .

Rajakerroksen paksuus on näytteenotto-olosuhteiden funktio, johon merkittävimmin vaikuttavat pinnoitteen säde, ilmavirran nopeus, ilman lämpötila sekä analyytin diffuusiovakio. Suurella ilmavirralla yhtälö (1) kuitenkin yliarvioi uuttuneen massan määrää. Myös suhteellinen ilmankosteus vaikuttaa kuidun kykyyn sitoa analyytteja. Yleisesti ottaen mitä suurempi on ilman suhteellinen kosteus sitä vähemmän kuituun uuttuu näytettä. (Koziel, Jia & Pawliszyn 2000.)

Diffuusiovakioita voidaan arvioida yhtälöllä (4). Se soveltuu poolittomille kaasumaisille yhdisteille matalissa ja kohtalaisissa lämpötiloissa (Fuller, Schettler & Calvin 1966.)

$$D_g = \frac{0,001 \cdot T^{1,75} \sqrt{\frac{1}{M_{ilma}} + \frac{1}{M_{VOC}}}}{p \left[ (\Sigma V_{ilma})^{\frac{1}{3}} + (\Sigma V_{VOC})^{\frac{1}{3}} \right]^2} , \quad (4)$$

missä  $D_g$  on diffuusiovakio ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $T$  on absoluuttinen lämpötila (K),  $M_{ilma}$  ja  $M_{VOC}$  ovat ilman ja analyytin molekyylimassoja,  $p$  on absoluuttinen paine (atm) ja  $V_{ilma}$  sekä  $V_{VOC}$  ovat ilman ja analyyttien moolitilavuuksia ( $\text{cm}^3/\text{mol}$ ).

## 2.5 Kapillaarikaasukromatografia

Kapillaarikaasukromatografia eli kaasukromatografia (GC, Gas Chromatography) on laajasti käytetty orgaanisten analytiikan perusekniikka, jolla voidaan määrittää useita analyytteja samasta näytteestä. Tekniikka soveltuu hajoamatta höyrystyville yhdisteille. (Jaarinen & Niiranen 2005, 183; Harris 2003, 597.)

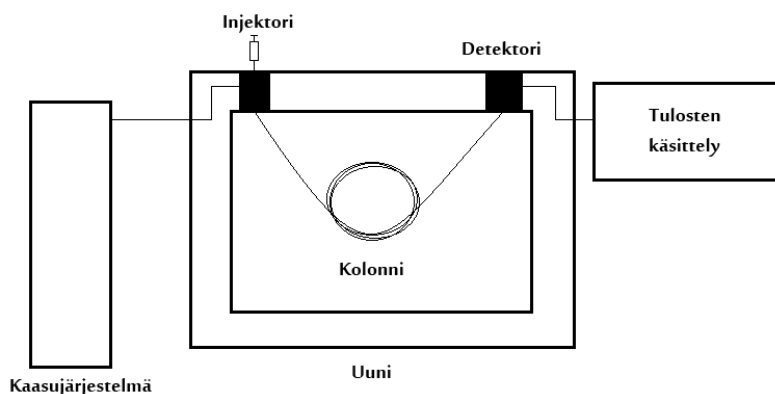


### 2.5.1 Periaate yleisesti

Laitteisto koostuu kaasujärjestelmästä, injektorista, uunista, kapillaarikolonnista ja detektorista (kuva 5). Kantajakaasuna käytetään typpeä, heliumia tai vetyä. Injektointi voidaan suorittaa käsin tai automatisoidusti. Injektointitekniikoita on jakoinjektio (split injection), jossa vain määritelty osa näytteestä etenee kolonniin, suorainjektio (splitless injection), jossa lähes koko näytemäärä etenee kolonniin sekä kolonniin injektio (on-column injection), jossa koko näytemäärä etenee kolonniin. (Jaarinen & Niiranen 2005, 183-184, 187-189; Harris 2003, 597.)

Yleensä näyte injektoidaan joko jako- tai suorainjektiolla kaasutiiviin septumiin lävitse kuumaan injektorin sisäputkeen, jossa näyte höyrystyy ja kulkeutuu kantajakaasun mukana kolonniin ja sieltä edelleen detektorille. Kolonni on asennettu uuniin, jonka lämpötilaa voidaan säätää ajon aikana. Lämpötila vaikuttaa yhdisteiden höyrystymiseen sekä tasapainoon liikkuvan faasin ja stationäärifaasin välillä, ja on täten erottumisen kannalta tärkeä parametri. (Jaarinen & Niiranen 2005, 183; Harris 2003, 597.)

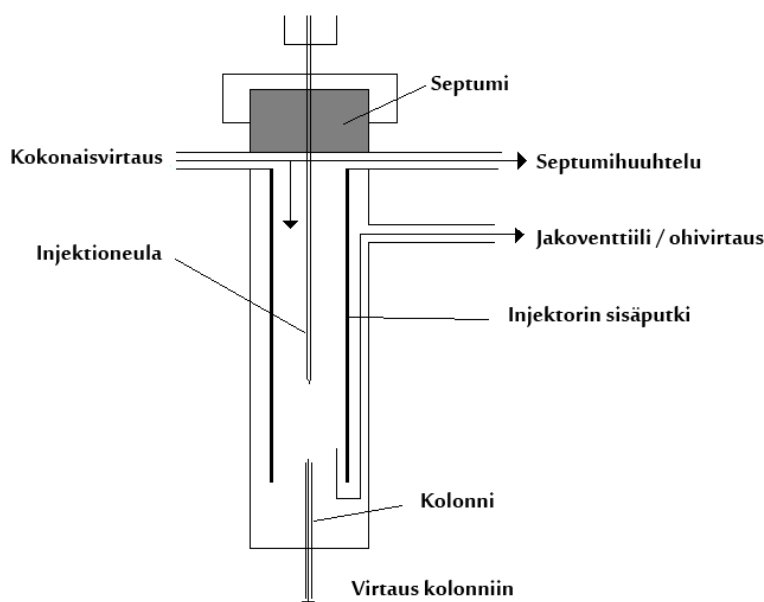
Detektori havaitsee yhdisteet ja lähettää signaalin tietokoneelle, jossa tulokset käsitellään. Kaasukromatografian etuna ovat herkäät yleisdetektorit sekä selektiiviset detektorit. Yleisdetektorina voidaan pitää liekki-ionisaatiodetektoria. Kun taas selektiivisiä detektoreita ovat esimerkiksi elektronisieppaus-, typpi-fosfori-, fotoionisaatio- ja lämmönjohdotokykydetektorit. Detektorina voidaan käyttää myös massaspektrometria, jolla on mahdollista tehdä sekä kvalitatiivista, että kvantitatiivista analyysia. (Jaarinen & Niiranen 2005, 184, 193-195; Harris 2003, 579.)



KUVA 5. Kaaviokuva kapillaarikaasukromatografista (Jaarinen & Niiranen 2005, 184, muokattu)

### 2.5.2 Suorainjektio

Suorainjektio (splitless injection) soveltuu pienten pitoisuuksien analyysiin. Suorainjektiossa jakoventtiili on suljettuna injektion aikana ja noin minuutin sen jälkeen. Tänä aikana koko näytemäärä kulkeutuu kolonniin ja höyrystynyt näyte tiivistyy kolonnin alkuosaan. Tiivistynyt liuotin pidättää näytemolekyylejä kunnes liuotin on haihtunut. Tätä kutsutaan liuotinefektiksi. Liuottimen haihduttua näytemolekyylit muodostavat kapean vyöhykkeen kolonniin ja jakoventtiili avataan (kuva 6). (Jaarinen & Niiranen 2005, 188-189; Harris 2003, 588-559.)



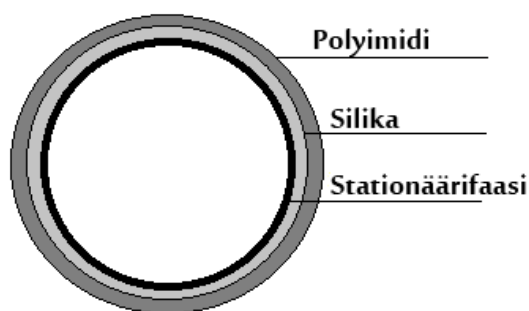
KUVA 6. Kaaviokuva injektoriportista (Jaarinen & Niiranen 2005, 187, muokattu)

### 2.5.3 Jakoinjektio

Jakoinjektiota käytetään, kun tutkittavat yhdisteet kestävät korkeita lämpötiloja ja niiden pitoisuus on riittävän suuri. Injektorin lämpötilan tulee olla riittävän suuri, jotta analyytit höyrystyvät nopeasti kaasufaasiin. Jakoinjektio säästää kolonnia, koska suuri osa näytteestä poistuu jakoventtiilin kautta (kuva 6). Injektion aikana jakoventtiili on auki. Kolonniin menevän ja ohivirtaavan kaasun jako suhde on yleensä 1:20 – 1:100. Sekä suora-, että jakoinjektiossa septumia huuhdellaan injektioinnin ja erottumisen ajan kaasuvirtauksella, jotta kolonniin ei pääsisi ylimääräisiä yhdisteitä septumin lävitse. (Jaarinen & Niiranen 2005, 187; Harris 2003, 588.)

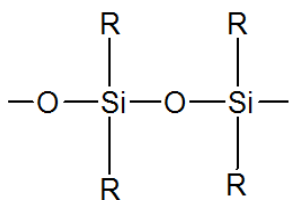
### 2.5.4 Kolonnit

Tyypillisesti kaasukromatografiassa käytetään noin 20 – 30 m:n pituisia kapillaarikolonneja. Kolonnin sisähalkaisijat ovat 0,5 mm:n molemmin puolin. Ohuessa kolonnissa massansiirto tapahtuu nopeammin kuin paksummassa. Kapillaarin sisäpinnalla on stationäärifaasi ohuena noin 0,5 µm:n paksuisena kerroksena ja kolonnin ulkopinta on päällystetty mekaanisesti kestäväällä polyimidillä (kuva 7). (Jaarinen & Niiranen 2005, 190-191; Harris 2003, 579, 581.)



KUVA 7 Poikkileikkaus kapillaarikolonnista (Jaarinen & Niiranen 2005, 191, muokattu)

Stationäärifaasit ovat inerttejä nesteitä. Ne kestävät korkeita lämpötiloja hajoamatta ja höyrystymättä. Stationäärifaasit on usein valmistettu polysiloksaanista, jonka ominaisuudet määräytyvät piiatomeihin sitoutuneiden orgaanisten ryhmien perustella (kuva 8). (Jaarinen & Niiranen 2005, 191; Harris 2003, 581.)



KUVA 8 Polysiloksaani, tyypillisiä sivuryhmiä ovat muun muassa metyyli- tai fenyyli-ryhmät (Jaarinen & Niiranen 2005, 191)

Kolonni valitaan tutkittavien yhdisteiden mukaan. Poolittomille yhdisteille parhaiten soveltuu pooliton kolonni ja voimakkaasti poolisille yhdisteille voimakkaasti poolinen kolonni. Ikääntyminen, happi sekä korkeat lämpötilat kuluttavat kolonnia, jolloin kromatogrammin piikit alkavat häntiä. Kulunutta kolonnia voidaan leikata alusta ja lopusta

ilman, että kolonnin tehokkuus juurikaan laskee (Jaarinen & Niiranen 2005,192; Harris 2003, 581.)

### **2.5.5 Liekki-ionisaatiodetektor**

Liekki-ionisaatiodetektor on herkkä ja laajalla alueella lineaarinen yleisdetektor. Se havaitsee yhdisteet, jotka muodostavat sähköisesti varattuja hiukkasia palaessaan happirikkaassa vetyliekissä. Detektorin herkkyys pienenee, jos tutkittavissa yhdisteissä on happi-, fosfori-, typpi-, rikki- tai halogeeniatomeja, eikä sillä voida havaita vettä, hiili-dioksidia tai jalokaasuja. (Jaarinen & Niiranen 2005, 193; Harris 2003, 591.) Kvantitatiivinen analyysi perustuu kromatogrammin piikkien pinta-alaan. Lineaarisella vastealueella piikkien pinta-ala on verrannollinen analyytin määrään. (Harris 2003, 590.)

Liekki-ionisaatiodetektorissa palaa kantokaasun, vedyn sekä ilman seos. Vedyn virtaus on suunnilleen sama kuin kantajakaasunkin. Ilmaa detektorille johdetaan ylimäärin hapettimeksi. Palaessaan osa molekyylien hiiliatomeista tuottaa elektroneja ja ioneja, jotka johdetaan sähkökentässä kollektorielektrodille ja syntynyt sähkövirta mitataan. Vaikka vain murto-osa hiiliatomeista tuottaa ionin palaessaan, ionituotanto on kuitenkin verrannollista mahdollisten detektorille etenevien hiiliatomien määrään ja mahdollistaa luotettavan analyysin. (Jaarinen & Niiranen 2005, 193; Harris 2003,591-592.) Alfa-pineeni koostuu vain hiilestä ja vedystä, joten liekki-ionisaatiodetektor soveltuu hyvin sen määrittämiseen.

### 3 TYÖN TAVOITTEET

Työn tarkoituksena oli kehittää kromatografinen menetelmä alfa-pineenin määrittämiseksi biosuodatinkoelaitteistossa. Tavoitteena oli kehittää luotettava, toistettava ja kvantitatiivinen menetelmä, jolla voitaisiin mitata ilmapirran alfa-pineenipitoisuutta ennen ja jälkeen biosuodattimen ja arvioida suodattimen alfa-pineenin poistotehokkuutta eri olosuhteissa. Lisäksi haluttiin selvittää kvalitatiivisesti vanhasta virtsasta haihtuvia VOC-yhdisteitä ja voidaanko niitä mitata SPME-menetelmällä.

Alfa-pineeniä ei esiinny virtsassa, mutta sen sijaan sitä on ulosteessa ja täten kuiva-käymälöissä. Alfa-pineenin biosuodatusta on tutkittu muun muassa paperi- ja sahateollisuudessa, joten aiheesta oli löydettävissä valmista tutkimustietoa. Tulevaisuudessa biosuodattimen alfa-pineenin poistotehokkuuden lisäksi voitaisiin työn pohjalta kehittää menetelmiä muiden hajuhaittoja aiheuttavien yhdisteiden määrittämiseksi.

## 4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 4.1 Esikokeet

Esikokeilla selvitettiin sopivaa näytteenottomenetelmää. Vaihtoehtoina pidettiin OR-BO™ 32 -adsorbenttiputkia ja SPME-kuituja. Adsorbenttiputket todettiin huonommaksi vaihtoehdoksi, koska niitä ei voitu altistaa suoraan laitteiston virtaukselle, vaan jokainen tarvitsi oman pumppunsa. Lisäksi lasiputkien käsittely oli haastavampaa kuin SPME-kuitujen ja analyysiin tarvittiin rikkihiiltä liuottimeksi.

Esikokeissa selvitettiin myös vanhasta virtsasta haihtuvia yhdisteitä massaspektrometrillä varustetulla kaasukromatografilla, mutta biosuodatinlaitteiston olosuhteissa VOC-yhdisteiden piikit olivat liian pieniä luotettavaan kvalitatiiviseen tunnistukseen. Kromatogrammeista oli kuitenkin nähtävissä, että näytteet sisälsivät huomattavan määrän yhdisteitä alfa-pineenin lisäksi.

### 4.2 Kromatografia

Alfa-pineenin määrittämiseen käytettiin Clarus 500 GC –kaasukromatografia, jossa oli liekki-ionisaatio –detektori. Kolonnina laitteessa oli Phenomenex Zebron™ ZB-5MSi 30 m x 0,25 mm x 0,50 µm –kolonni, joka soveltui poolittomien yhdisteiden erotteluun (Phenomenex 2012). Sopiva menetelmä laadittiin terpeenien määrittämiseen tarkoitettua NIOSH-standardia mukaillen (The National Institute for Occupational Safety and Health 1996).

### 4.3 Standardit

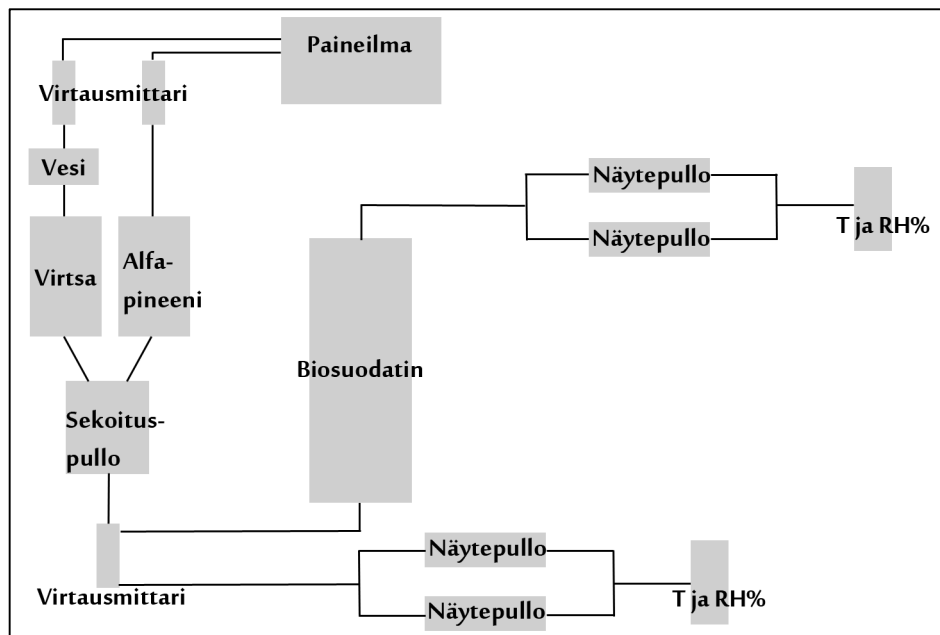
SPME-kuituihin uuttuneen alfa-pineenin (98%, Sigma-Aldrich) määrää pyrittiin määrittämään rikkihiileen ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich) valmistetuilla alfa-pineenistandardeilla, jotka valmistettiin mittauspäivinä NIOSH-standardia mukaillen (The National Institute for Occupational Safety and Health 1996). Kantaliuokseen punnittiin 200 mg alfa-pineeniä ja se liuotettiin 100 ml:n rikkihiiltä. Edellä mainitusta liuoksesta laimennettiin

lopun standardit. Standardien pitoisuus 1 µl:n injektiota kohden oli 0,002 µg:n ja 2 µg:n välillä (liite 1). Kustakin liuoksesta otettiin vähintään kaksi rinnakkaista näytettä analysoitavaksi.

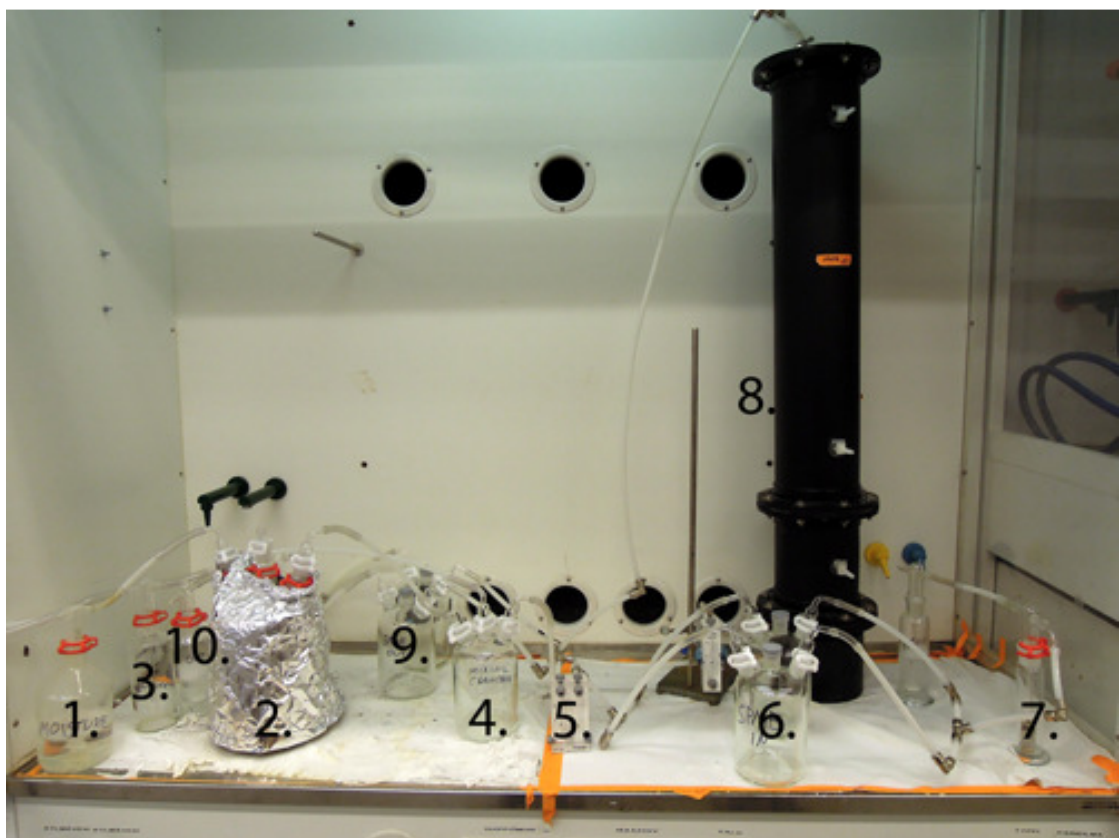
#### 4.4 Koelaitteisto

Koelaitteistossa paineilmaa johdettiin biosuodattimen lävitse (kuva 9 & 10). Laitteistossa oli kaksi linjaa, jotka sekoittuivat toisiinsa sekoituspullossa ennen suodattimelle tuloa. Toinen linja kulki ensin veden lävitse kaasunpesupullossa kostuttaen ilmaa ennen etenemistä virtsapullon kautta sekoituspulloon. Virtsapullo (woulffin-pullo) ei ollut täynnä virtsaa, vaan virtasta haihtuvat yhdisteet kulkeutuivat pullon ilmatilasta eteenpäin. Toinen linja kulki kaasunpesupullon lävitse, jonka pohjalla oli alfa-pineeniä, ennen päätymistä sekoituspulloon. Molempien linjojen virtausta voitiin säätää virtausmittareilla. Näin voitiin karkeasti säätää seoksessa olevan alfa-pineenin osuutta.

Sekoituspullon jälkeen virtaus jaettiin kahtia kaksikanavaisella virtausmittarilla. Toinen linja oli sisääntulo, johon liitettiin kaksi woulffin-pulloa rinnakkain ja linjan loppuun asennettiin pullo, johon laitettiin MSR 145 -tallennin. Rinnakkaisasennus auttoi näytteenotossa, jolloin saatiin samalle ajanhetkelle kaksi mittausta. Tallennin mittasi lämpötilaa sekä suhteellista kosteutta. Toinen linja oli ulostulo. Se kulki biosuodattimen läpi, jonka jälkeen oli yllämainitun kaltainen rinnakkaisasennus sekä tallennin. Näin voitiin ottaa näytteitä ilmapirrasta ennen ja jälkeen suodattimen.



KUVA 9. Kaaviokuva koelaitteistosta.



KUVA 10. Biosuodatinkoelaitteisto: 1. kosteutuspullo 2. virtsa 3. alfa-pineeni 4. sekoituspullo 5. virtausmittari 6. sisäänmenonäytteenotto 7. sisäänmenotallennin 8. biosuodatin 9. ulostulonäytteenotto 10. ulostulotallennin (Kuva: Matti Haaponiemi 2012)

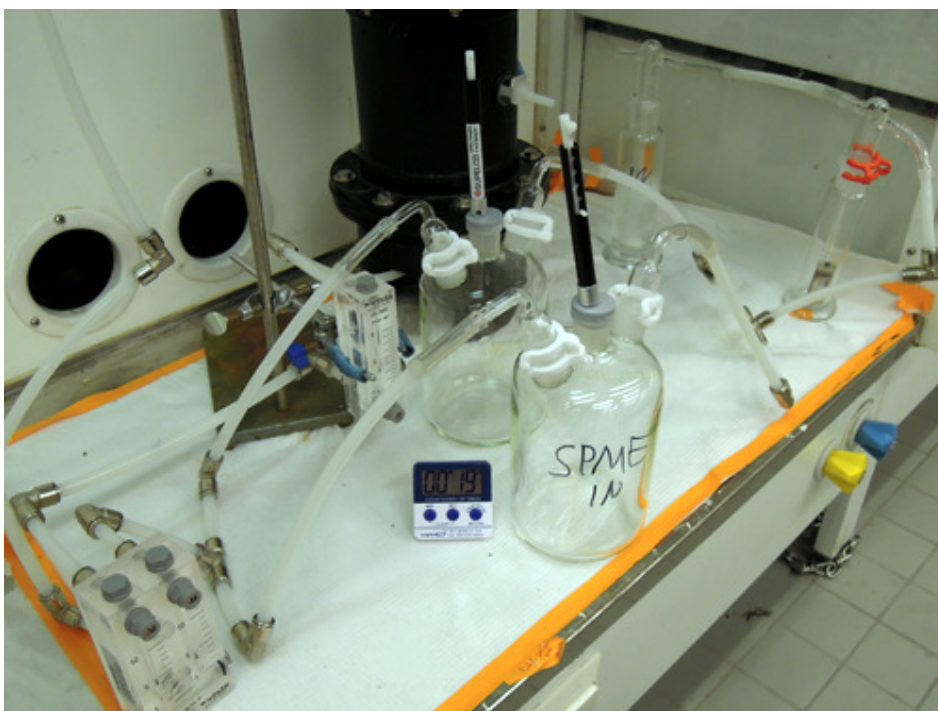


#### 4.5 Näytteenotto

Biosuodatinkoelaitteiston sisään- ja ulostulolinjat jaettiin kahdeksi linjaksi, joihin molempiin asennettiin woulffin-pullo septumilla (kuva 11). Linjat liitettiin jälleen yhdeksi pullojen jälkeen. Tällä asennuksella tavoiteltiin rinnakkaisnäytteenottoa epävakaassa laitteistossa.

Näytteet otettiin työntämällä kahden SPME-näytteenottolaitteen neulat omiin pulloihin sa septumien lävitse ja paljastamalla kuidut yhtäaikaaisesti. Näytteenottoaika mitattiin hälytyskellolla, minkä päätteeksi kuidut vedettiin neulojen sisään samanaikaisesti ja neulat poistettiin pulloista.

Kaikkia SPME-kuituja puhdistettiin vähintään yksi tunti kaasukromatografian injektioportissa 300 °C:ssa ennen näytteenottoa. Puhdistuksessa käytettiin vanhaa kaasukromatografia (kuva 12).



KUVA 11. Järjestely rinnakkaisten näytteiden ottoon (Kuva: Matti Haaponiemi 2012)



KUVA 12. Puhdistukseen käytetty kaasukromatografi (Kuva: Matti Haaponiemi 2012)

Kirjallisuudessa esitetyn teorian ja tutkimuksen mukaan Carboxen/PDMS –kuituja voidaan käyttää myös epätasapainotilassa, kunhan detektorin vaste on lineaarisella alueella (Koziel, Jia, Pawliszyn 2000). Sopivaa näytteenottoaikaa tutkittiin ottamalla kolme näytettä näytteenottoajoilla 5 s, 10 s, 20 s, 40 s ja 60 s. Kaksi näytettä kustakin sarjasta otettiin samanaikaisesti ja kolmas ilman rinnakkaisnäytettä.

#### 4.6 Menetelmän arviointi

Menetelmän luotettavuutta arvioitiin tilastollisten tunnuslukujen avulla. Näitä tunnuslukuja olivat lineaarisuus, keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Myös toteamis- ja määritysrajaa tarkasteltiin. Koska laitteisto ei toistaiseksi pystynyt tuottamaan riittävän vakaata ilmavirtaa, menetelmän toistettavuuteen ei tässä menetelmäkehityksen vaiheessa keskitytty.

#### 4.6.1 Lineaarisuus

Lineaarisella mittausalueella detektorin vasteen ja analyytin pitoisuuksien välillä on lineaarinen korrelaatio eli ne ovat suoraan verrannollisia toisiinsa (Jaarinen & Niiranen 2005, 13).

#### 4.6.2 Keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta

Analyysitulokset lasketaan yleensä rinnakkaisten näytteiden tulosten keskiarvona. Keskiarvo lasketaan yhtälöllä (5) (Lehtonen 2006, 97).

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_{n-1} + x_n}{n} , \quad (5)$$

missä  $x_1, x_2, x_3$  ovat mittaustuloksia ja  $n$  on mittausten lukumäärä.

Tärkein hajontaluku on keskihajonta. Se kuvaa mittaustuloksen etäisyyttä oikeana pidettyyn arvoon. Keskihajonnan tulisi olla mahdollisimman pieni. Keskihajonta lasketaan yhtälöllä (6). (Lehtonen 2006, 98.)

$$s = \frac{\sqrt{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}}{n-1} , \quad (6)$$

missä  $x_1, x_2, x_3$  ovat mittaustuloksia,  $n$  on mittausten lukumäärä ja  $\bar{x}$  on mittausten keskiarvo.

Suhteellinen keskihajonta (RSD, Relative Standard Deviation) ilmoitetaan usein prosentteina ja se lasketaan yhtälöllä (7) (Lehtonen 2006, 99).

$$\%RSD = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} , \quad (7)$$

missä  $s$  on keskihajonta ja  $\bar{x}$  on keskiarvo.

### 4.6.3 Toteamis- ja määrittysraja

Toteamisrajana voidaan pitää analyytin pitoisuutta, jolla mittalaitteen signaalin taso poikkeaa merkittävästi nollanäytteen signaalista. Esimerkiksi kolme kertaa nollanäytteen keskihajonta, jolloin toteamisraja määritetään yhtälön (8) mukaisesti. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13.)

$$toteamisraja = \bar{x}_{nollanäyte} \pm 3s , \quad (8)$$

missä  $s$  on keskihajonta ja  $\bar{x}_{nollanäyte}$  on nollanäytteiden keskiarvo.

Määrittysraja on näytematriisista mitattu analyytin pienin pitoisuus, jolle kvantitatiivisia mittauksia voidaan suorittaa tietyllä luotettavuustasolla. Myös määrittysraja lasketaan nollanäytteen keskihajonnan avulla esimerkiksi yhtälön (9) mukaisesti. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13).

$$määrittysraja = \bar{x}_{nollanäyte} \pm 10s , \quad (9)$$

missä  $s$  on keskihajonta ja  $\bar{x}_{nollanäyte}$  on nollanäytteiden keskiarvo.

## 5 TULOKSET

### 5.1 Menetelmän kehittäminen

Menetelmän kehittäminen aloitettiin näytteenottotekniikan valinnalla. Esikokeissa testattiin ORBO™ 32 –adsorbenttiputkia sekä Carboxen/PDMS –kuituja, joista jälkimmäiset osoittautuivat soveltuvan laitteistolle paremmin. Seuraavaksi alettiin tutkia kuiduille soveltuvaa kaasukromatografista menetelmää.

Alustavat ajo-olosuhteet valittiin terpeenien määrittämiseen tarkoitettua NIOSH –standardia mukaillen (The National Institute for Occupational Safety and Health 1996). Koeajojen tulosten perusteella injektorin lämpötila nostettiin 300 °C:een, jotta desorptio kuiduista tapahtuisi mahdollisimman täydellisesti. Aloituslämpötila nostettiin 40 °C:een jäähdytysajan lyhentämiseksi ja lämpötilaohjelman loppuun lisättiin varmuuden vuoksi ylimääräinen lämpötilan kohotus lähelle kolonnin maksimilämpötilaa kolonnin puhdistamiseksi.

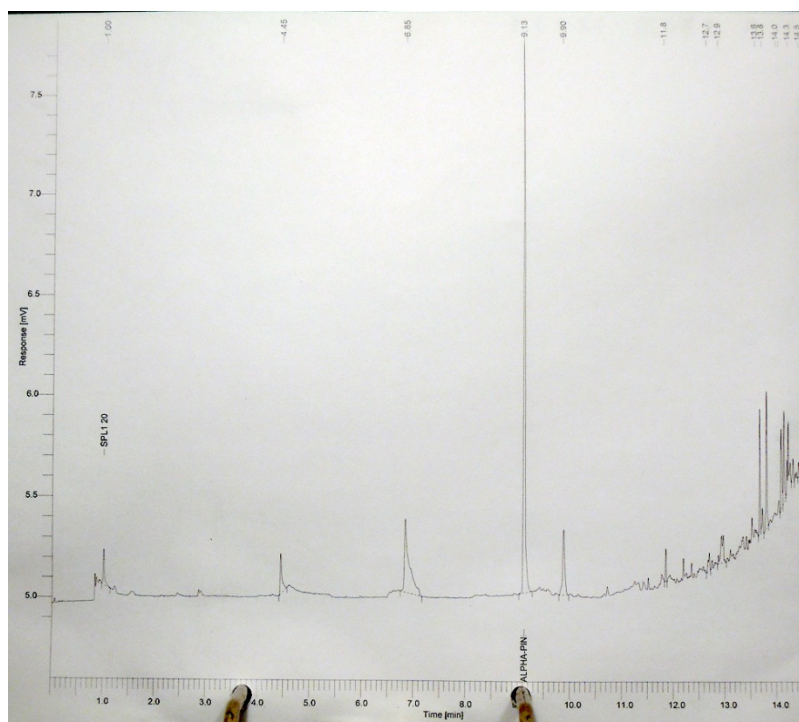
Kaasukromatografian ohjekirjan suosituksen mukaisesti ajon alkuun säädettiin kantokaasuvirtausta paineiskun luomiseksi. Tällä toimenpiteellä pyrittiin minimoimaan kaasun laajentuminen injektorin sisäputkeen ja maksimoimaan näytteen siirtyminen kolonniin, jolloin odotettavissa oli paremman muotoiset piikit ja parempi saanto (Perkin Elmer 2002, 3-48).

Detektorin herkkyyttä säädettiin pienemmäksi, jotta korkeimmat piikit näkyivät kokonaisina. Tätä ennen piikit saattoivat katketa, koska detektori saturoitui. Injektorin sisäputkeksi valittiin SPME-kuiduille tarkoitettu kapea suorainjektiosisäputki (splitless liner). Kuidut injektioitiin käsin ja nestemäiset standardit automaattisesti. Lopulliset valitut ajo-olosuhteet on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Menetelmäkehityksessä käytetyt lopulliset ajoparametrit

Injektiotilavuus	1 µl
Injektorin lämpötila	300 °C
Injektorin sisäputki	Supelco 0,75 mm
Detektorin lämpötila	300 °C
Suorainjektio	pre-run -1,5 min, split 1/20 päälle 1 min
Uunin lämpötilaohjelma	40 °C 1 min, 10 °C/min 135 °C, 45 °C/min 320 °C
Ajoaika	14,61 min
Kantokaasu	Helium
Kantokaasuohjelma	4 ml/min 0,25 min, 1 ml/min loppuun
Kolonne	Zebron™ ZB-5Msi 30 m x 0,25 mm x 0,50 µm

Valituilla ajo-olosuhteilla alfa-pineenin retentioaika oli 9,15 - 9,22 min. Retentioaika kasvoi alfa-pineenin konsentraation kasvaessa. Biosuodatinlaitteistosta otettujen näytteen kromatogrammeissa alfa-pineeni erottui selkeästi suurimpana piikkinä eikä samalla retentioajalla ollut muita piikkejä (kuva 13).



KUVA 13. Kromatogrammi SPME-kuidun analyysistä. Vaaka-akselilla aika (min) ja pystyakselilla detektorin vaste (µV). Korkein piikki on alfa-pineeni

### 5.1.1 Standardisuoran lineaarisuus

Alfa-pineenille määritettiin standardisuora viidesti eri päivinä (taulukko 2). Ensimmäisessä analyysissä oli kaksi rinnakkaisnäytettä kutakin standardiliuosta muissa ajoissa kolme.

Standardiliuosten valmistus oli haastavaa. Liuottimena käytetty rikkihiili oli viskositeetiltaan pientä ja sen pipetointi vaati nopeutta, tarkkuutta sekä huolellisuutta. Rikkihiili oli myös todella voimakkaasti haihtuvaa, myrkyllistä ja työskentely vetokaapissa sekä erikoiskäsineet lisäsivät käsityön haasteellisuutta.

Standardisuorien korrelaatiokertoimet olivat vähintään 0,9937 mutta detektorin vaste vaihteli huomattavasti eri mittauspäivien välillä. Mittaussarjojen sisällä suhteellinen keskihajonta oli kohtuullisen hyvää. Suhteellisen keskihajonnan tulisi olla mahdollisimman lähellä nollaa. Varsinaista validoimisrajaa ei määritelty.

Osa nollanäytteistä kontaminoitui valmistuksen yhteydessä ja osa nollanäytteistä kontaminoitui analyysilaitteessa, jolloin ensimmäisessä nollanäytteessä näkyi alfa-pineeniikki mutta seuraavissa kahdessa näytteessä se vaimeni merkittävästi tai hävisi kokonaan. Kontaminaatiolähde saattoi olla injektioneula. Parempaan analyysiin päästäisiin lisäämällä neulan pesujen määrää. Toinen vaihtoehto voisi olla ylimääräiset nollanäytteet näytteiden välissä mutta tällöin analyysiaika kasvaisi merkittävästi.

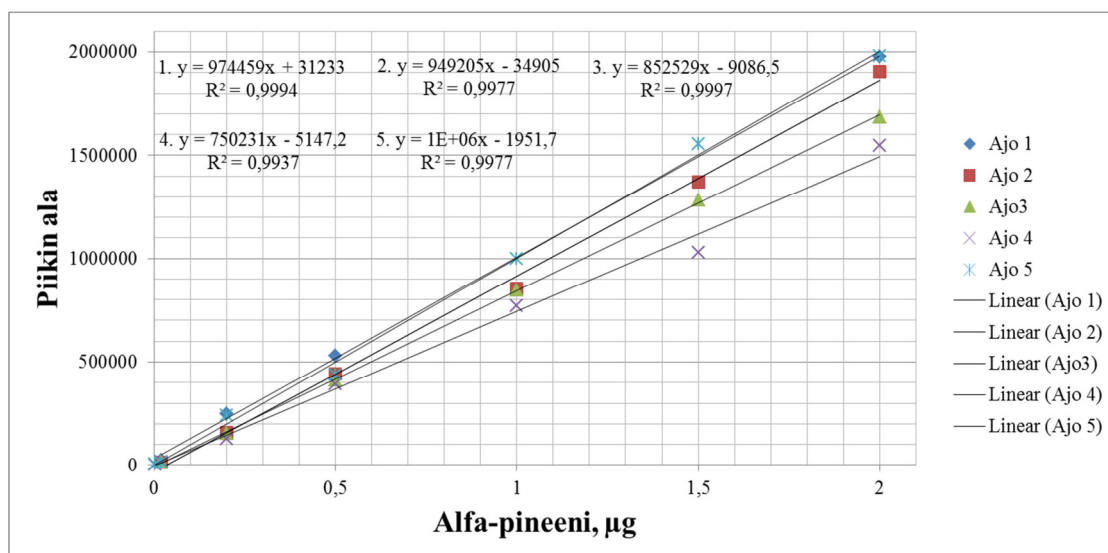
TAULUKKO 2. Alfa-pineenistandardien mittaustulokset. Virhe tarkoittaa valmistusvirhettä ja \* merkitty tulos kontaminaatiota

Ajo 1			Ajo 2		
a-pineeni, µg	Pinta-ala	%RSD	a-pineeni, µg	Pinta-ala	%RSD
0,0			0,0	2190	118,56
0,002			0,002		
0,02	22500	5,93	0,02	12949	1,51
0,2	248151	6,82	0,2	157413	1,85
0,5	529284	6,73	0,5	443724	2,97
1,0	virhe	virhe	1,0	854908	4,71
1,5	virhe	virhe	1,5	1372364	6,60
2,0	1975525	1,62	2,0	1904062	10,53
korrelaatio 0,9994			korrelaatio 0,9978		
Ajo 3			Ajo 4		
a-pineeni, µg	Pinta-ala	%RSD	a-pineeni, µg	Pinta-ala	%RSD
0,0	467	14,84	0,0	133	173,21
0,002			0,002	1287	8,96
0,02	15142	13,28	0,02	15634	10,61
0,2	153666	0,46	0,2	126306	1,99
0,5	410491,7	5,15	0,5	391400	17,40
1,0	844984,7	7,36	1,0	771487	1,56
1,5	1286169	9,50	1,5	1027440	3,64
2,0	1685229	13,04	2,0	1548120	8,89
korrelaatio 0,9998			korrelaatio 0,9944		
Ajo 5					
a-pineeni, µg	Pinta-ala	%RSD			
0,0	20845 *	13,96			
0,002	3275	8,87			
0,02	12602	8,13			
0,2	239882	8,66			
0,5	438896	3,40			
1,0	997483	10,11			
1,5	1553573	8,48			
2,0	1979594	4,54			
korrelaatio 0,9977					

Määrittys- ja toteamisrajan laskeminen oli vaihtelevien nollanäytteiden vuoksi hankalaa. Kromatogrammeista oli nähtävissä pienikin alfa-pineenipitoisuus, kuten peräkkäisistä nollanäytteistä huomattiin. Saatujen tulosten perusteella määrittysraja oli luultavasti noin 0,002 µg/ µl, mutta se vaatii vielä tarkempaa selvitystyötä.



Tuloksista kävi selkeästi ilmi, että standardisuora tulisi aina tehdä samana päivänä kuin SPME-kuitujen mittauss. Pienet pitoisuudet voitaisiin mahdollisesti määrittää vanhemmallakin suoralla, sillä standardisuorat hajaantuivat voimakkaammin pitoisuuden kasvaessa (kuvio 3).



KUVIO 4. Alfa-pineenistandardisuorat muodostettiin kromatogrammin piikin pinta-alan ja injektoidun alfa-pineenin massan funktiona

### 5.1.2 Näytteenotto ja lineaarisuus

SPME-kuiduilla rinnakkaisia näytteitä oli hankala ottaa ja näytteiden suhteellinen keskihajonta oli keskimäärin noin 12 %. Muutamissa testimittauksissa suhteellinen keskihajonta oli noin 2 %, mutta koko aineistoa tutkittaessa tällaiset tulokset vaikuttivat satumilta.

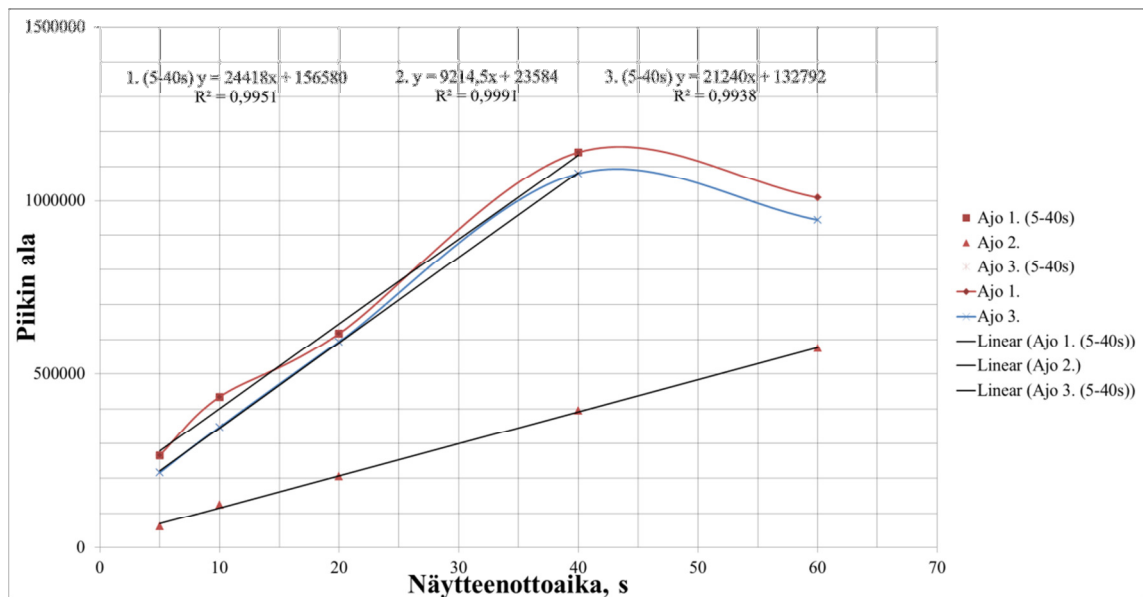
Näytteenottoajan tuli olla vasteen lineaarisella alueella. Alueen pituuteen vaikuttivat koelaitteiston virtausnopeudet, lämpötila, suhteellinen kosteus, lisätyn alfa-pineenin määrä ja sen haihtumisnopeus. Lineaarisuutta tutkittiin viidellä eri näytteistysajalla välillä 5 s – 60 s. Kussakin mittauspisteessä otettiin kolme näytettä, joista kaksi oli rinnakkaisia (taulukko 3).

Laitteistoon lisätyn alfa-pineenin määrää ei pidetty vakiona, vaan se vaihteli, mikä selittää erimuotoiset käyrät kuviossa 4. Reaalitilanteessa analyytin pitoisuus vaihtelee myös.

TAULUKKO 3. Lineaarisuusajojen tulokset. \*tekniisiä ongelmia mittauksessa

Ajo 1					
Aika, s	Pinta-ala	%RSD	T, °C	RH, %	Virtaus α-p/virtsa, l/min
5	266187,87	6,65	20	96,1	0,3/5
10	434172,95	12,29			
20	616652,74	1,21			
40	1140635,01	21,93			
60	1009180,557	21,72			
Ajo 2					
Aika, s	Pinta-ala	%RSD	T, °C	RH, %	Virtaus α-p/virtsa, l/min
5	61970,17	12,34	19,6	96,8	0,65/5
10	124737,97	9,19			
20	205283,02	13,5			
40	395963,94	12,26			
60	573925,09	12,33			
Ajo 3					
Aika, s	Pinta-ala	%RSD	T, °C	RH, %	Virtaus α-p/virtsa, l/min
5	216598,31	4,67	*	*	0,3/5
10	347583,18	11,35			
20	593173,50	12,74			
40	1079839,50	19,54			
60	944568,03	10,34			

Kaikissa kolmessa mittauksessa massansiirto kuituun oli lineaarista 40 s asti ja korrelaatiokerroin oli vähintään 0,994 (kuvio 4). Kahdessa mittauksista ohitettiin lineaarinen alue ja lähestyttiin tasapainotilaa. Koska alfa-pineenin konsentraatio ilmassa vaihteli, yksiselitteistä näytteenottoaika ei voitu valita, vaan lyhyemmän todettiin olevan parempi. Tällöin myös molekyylien välinen kilpailu sitoutumispaikoista oletettiin vähenvän.



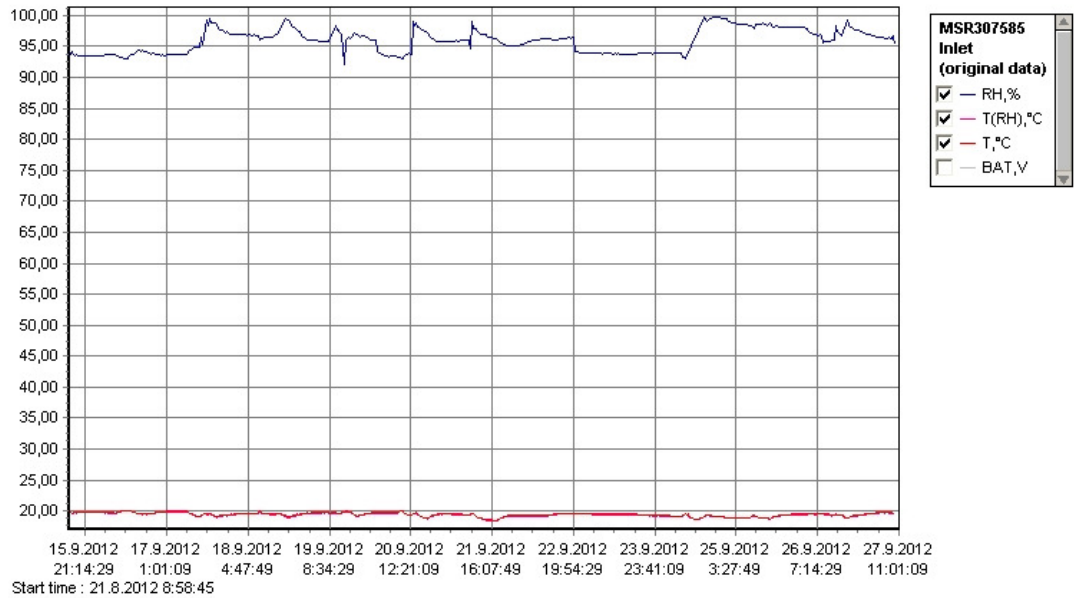
KUVIO 5. Lineaarisuuden selvitys näytteenottoajan ja piikin pinta-alan funktiona. Ajojen 1 ja 3 lineaarisuus määritettiin aikavälillä 5 - 40 s

### 5.1.3 Lämpötila ja suhteellinen kosteus

Laitteistossa virtaavan ilman lämpötilaa ja suhteellista kosteutta tarkkailtiin tallentimien avulla. Ulostulolinjan mittalaite ei toiminut odotetusti, vaan mittasi pelkästään lämpötilaa. Lämpötila oli kummassakin linjassa likimain vakio, noin 20 °C.

Suhteellinen kosteus vaihteli sisäänmenolinjassa noin 80 % - 100 % välillä. Näytteenoton lineaarisuutta määrittäessä suhteellinen kosteus oli noin 93 % - 100 % (kuvio 5). Ulostulolinjan kosteutta ei saatu laitevian vuoksi mitattua, mutta sen täytyi olla suurempi tai yhtä suuri kuin sisäänmenolinjassa, sillä suodattimesta haihtui kosteutta ja ulostulolinjan pullojen sisäpinnoille tiivistyi vettä.

Suhteellinen kosteus vaikuttaa negatiivisesti kuidun kykyyn sitoa analyytteja. Täten sisäänmenon matalampi kosteusprosentti ulostuloon verrattuna saattaa vaikuttaa uutto-  
tehokkuuteen. Korkeampi lämpötila parantaa kuitujen kykyä sitoa analyytteja. Koska  
lämpötila oli sisäänmeno- ja ulostulolinjassa likimain sama, sen vaikutus uuttoproses-  
siin oletettiin olevan lähes merkityksetön.



KUVIO 6. Lämpötila (alhaalla) ja suhteellinen kosteus (ylhällä) ajan funktiona koelait-  
teiston sisäänmenolinjassa

## 6 POHDINTA

Menetelmässä biosuodatinlaitteistosta otettiin ilmanäytteitä epätasapainotilassa Carboxen/PDMS SPME-kuiduilla, jotka analysoitiin kapillaarikaasukromatografilla ja liekki-ionisaatiodetektorilla. Laitteistossa virtaavan alfa-pineenin määrää pyrittiin arvioimaan nestemäisten alfa-pineenistandardien detektorivasteen perusteella.

Työn tavoitteena oli tutkia ja kehittää biosuodattimen haitta-aineiden poistotehokkuuden analyysiä. Alustava menetelmä kehitettiin alfa-pineenin määrittämiseksi biosuodatinlaitteistosta kuivakäymälöiden hajuhaittojen tutkimukseen, jonka pohjalta voitaisiin kehittää menetelmiä muiden haitta-aineiden analyysiin. Tutkimustuloksia voitaisiin soveltaa myös muissa ilmansuodatusta vaativissa olosuhteissa, missä haihtuvat orgaaniset yhdisteet voivat muodostaa haju- tai terveyshaittoja.

Menetelmä näyttäisi soveltuvan biosuodattimen poistotehokkuuden määrittäykseen. Koska kokeessa käytettiin vain virtsaa eikä koko käymäläjätteen kirjoa, reaalityönteossa saattaa esiintyä analyysia häiritseviä yhdisteitä. Näytteenottoaika olisi hyvä pitää alle minuutissa. Lyhyt näytteenottoaika toisaalta vähentää molekyylien välistä sitoutumiskilpailua, mutta toisaalta se lisää virhettä näytteenoton ajanotossa. Sopiva näytteenottoaika tulisi selvittää tapauskohtaisesti, mutta sen voidaan arvioida karkeasti olevan noin 20 s.

Menetelmä on toistaiseksi semi-kvantitatiivinen. Sillä voidaan vertailla sisääntulon ja ulostulon suhteellista analyyttipitoisuutta ja biosuodattimen prosentuaalista poistotehokkuutta. Menetelmän ei pitäisi tarvita ulkoista kalibrointia, koska analyyttien diffusiovakiot voidaan määrittää laskennallisesti (Koziel, Jia & Pawliszyn 2000; Fuller, Schettler & Calvin 1966). Mutta koska näytetaustana oli ilman, alfa-pineenin ja virtsasta haihtuvien yhdisteiden sekoitus, tarkkaa arvioita analyytin diffusiovakioista ei voitu laskea yhtälöllä (3). Lisäksi yhtälö (1) antaa liian suuria konsentraatioita suurella ilmavirralla, mutta pullossa virtausnopeuden pitäisi olla pieni. Myös yhtälö suurille ilmavirroille voitaisiin kehittää (Koziel, Jia, Khaled, Noah & Pawliszyn 1999; Koziel, Jia & Pawliszyn 2000.)

Vaihtoehtona laskennalliselle määrittäykselle olisi ulkoisten standardien valmistus. Ulkoiset standardit voitaisiin tehdä ostamalla tai valmistamalla itse permeaatioputkia, jois-

ta haihtuisi analyyttiä vakiolämpötilassa vakionopeudella. Myös laitteistoa pitäisi kehittää tarkemmaksi lämpötilan, suhteellisen kosteuden sekä ilmavirran suhteen. (Koziel, Martos & Pawliszyn 2004). Esimerkiksi permeaatioputkien pitäisi olla termostoidussa astiassa (Janicki, Wolska, Górecki & Namiesnik 1993). Näin voitaisiin myös arvioida toistettavuutta luotettavasti, koska analyytin määrää ilmavirrassa voitaisiin hallita tarkemmin. Massaspektrometrillä varustettu kaasukromatografi olisi myös kätevä laajenettaessa menetelmää useammalle analyyttille.

Kehitetty menetelmä kaipaa vielä lisäkehitystä. Suurimmaksi ongelmaksi koettiin laitteiston epätasainen ilmavirta, koska pienilläkin ilmavirran vaihteluilla kuidun läheisyydessä on suuri merkitys (Koziel, Jia & Pawliszyn 2000). Ilmavirrasta voisi saada tasaisemman teknisillä ratkaisulla.

Työtä aloittaessa tutkimusryhmällä ei ollut kokemusta SPME-kuiduista ja -tekniikoista. PDMS-kuiduilla kvantitointi voisi onnistua helpommin, sillä niiden uuttoprosessissa ei esiinny kilpailua analyyttien välillä eri tyyppisestä pinnoitemateriaalista johtuen (Koziel, Jia & Pawliszyn 2000; Shirey & Mindrup 1999). Tällöin näytteenottoaika pitäisi olla riittävän pitkä, jotta tasapainotila saavuttaisiin. Suuri yli 90 % suhteellinen kosteus saattaisi silti aiheuttaa kilpailua veden ja analyyttien sitoutumisesta kuituun (Martos & Pawliszyn 1997). PDMS-kuitujen kalibrointia on myös tutkittu biosuodatuslaitteistoissa (Rupar-Gadd ynnä muut 2006). Kalibrointi tulisi tehdä näytetaustaa vasten, joka tässä tapauksessa olisi virtsainen ilma. Suljettuihin astioihin lisättäisiin tunnettu määrä analyyttiä ja tietyn tasapainotusajan jälkeen otettaisiin näyte SPME-kuidulla.

Menetelmäkehitys on varsin laaja-alaista työskentelyä, jossa suunnitellaan ja toteutetaan niin sovelluksen teknisiä ratkaisuja kuin analyysiäkin. Vaikka tutkimuksessa ei saavuttukaan täysin toimivaa analyysimenetelmää, saatiin sillä silti kartutettua tärkeää osaamista ja käytännön kokemusta käytetyistä tekniikoista, laitteista ja menetelmäkehityksen moninaisista haasteista.

## LÄHTEET

The Council of the European Union. 1999. Council directive 1999/13/EC of 11 March 1999 on the limitation of emissions of volatile organic compounds due to the use of organic solvents in certain activities and installations. Official Journal of the European Communities L85/1.

Devinny, J. Deshusses, M. Webster, T. 1999. Biofiltration for air pollution control. CRC Press LLC

Fuller, E. Schettler, P. Calvin, J. 1966. NEW METHOD FOR PREDICTION OF BINARY GAS-PHASE DIFFUSION COEFFICIENTS. Industrial & engineering chemistry 58(5), 18-27.

Garner, E. Smith, S. Lacy Costello, B. White, P. Spencer, R. Probert, C. Ratcliffe, N. 2007. Volatile organic compounds from feces and their potential diagnosis of gastrointestinal disease. The FASEB Journal vol. 21 no. 8 1675-1688.

Goosse, P. 2009. NoMix toilet system: first monitoring results from the Chriesbach Forum. GWA Magazin, Vol. 7, p. 567

Harper, M. 2000. Sorbent trapping of volatile organic compounds from air. Journal of Chromatography A, 885, 129-151.

Harris, D. 2003. Quantitative Chemical Analysis 6th edition. New York: W.H Freeman and Company. 578-601

Haynes, W (toim.). 2013. CRC Handbook of Chemistry and Physics 93rd edition Internet Version.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. Uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Janicki, W. Wolska, L. Górecki, T. Namiesnik, J. 1993. Apparatus for Calibration of Gas Chromatographic System for Thermal Desorption. Chemia Analityczna (Warsaw), 38, 423.

Kennes, C. Veiga, M. 2001. Bioreactors for waste gas treatment. Kluwer academic publisher

Koziel, J. Martos, P. Pawliszyn J. 2004. System for the generation of standard gas mixtures of volatile and semi-volatile organic compounds for calibrations of solid-phase microextraction and other sampling devices, Journal of Chromatography A, Volume 1025, Issue 1, 30 January 2004, Pages 3-9.

Koziel, J. Jia, M. Pawliszyn, J. 2000. Air Sampling with Porous Solid-Phase Microextraction Fibers. Analytical Chemistry, vol 72, no. 21.

Koziel, J. Jia, M. Khaled, A. Noah, J. Pawliszyn, J. 1999. Field air analysis with SPME device. Analytica Chimica Acta 400, 153-162.

- Lehtonen, P. 2006. Kemian laskut laboratoriossa. s 97-99. Helsinki: Hakapaino
- Liu, W. 2005. Handbook of Chiral Chemicals Second Edition; 5 Terpenes: The Expansion of the Chiral Pool. CRC Press
- Martos, P. Pawliszyn, J. 1997. Calibration of Solid Phase Microextraction for Air Analyses Based on Physical Chemical Properties. Analytical Chemistry Vol. 69 No 2. 206-215.
- Müller, T. Thissen, R. Braun, S. Dott, W. Fischer, G. 2004. (M)VOC and Composting Facilities. Environmental Science and Pollution Research International. 2004;11(3):152-7.
- The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). 1996. Terpenes. Method: 1552, issue 1.
- Perkin Elmer. 2002. Clarus 500 GC Users Guide. 3-48
- Phenomenex. 2012. Phenomenex GC Brand: Zebron with phase: ZB-5MSi. Www-sivu. Luettu 7.12.2012. <http://www.phenomenex.com/Products/GCDetail/Zebtron/ZB-5MSi>
- Rupar-Gadd, K. Bagherbour, M. Holmstedt, G. Welander, U. Sanati, M. 2006. Solid phase micro extraction fibers, calibration for use in biofilter applications. Biochemical Engineering Journal 31 107-112.
- Scheppers Wercinski, S. Pawliszyn, J. 1999. Solid Phase Microextraction: A PRACTICAL GUIDE; Chapter 1 Solid Phase Microextraction Theory. CRC Press.
- Shirey, R. Mindrup, R. 1999. SPME-Adsorption versus Absorption: Which Fiber is Best for Your Application? SUPELCO. PDF-tiedosto. Luettu 12.11.2012. [http://www.youngwha.com/tech/upload/t400011\\_fiber%20selection%20guide\\_ppt.pdf](http://www.youngwha.com/tech/upload/t400011_fiber%20selection%20guide_ppt.pdf)
- Supelco. 1997. SPME Portable Field Sampler with Carboxen/PDMS Fiber; Product specification. PDF-tiedosto. Luettu 7.12.2012. [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Product\\_Information\\_Sheet/4798.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/4798.pdf)
- Supelco. 1998. ORBO Solvent Desorption Tubes – Product Specification. PDF-tiedosto. Luettu 17.12.2012. [http://www.lsc.gr/attachments/File/ORBO\\_SOLVENT\\_DESORPTION\\_TUBES.pdf](http://www.lsc.gr/attachments/File/ORBO_SOLVENT_DESORPTION_TUBES.pdf)
- Tangerman, A. 2009. Measurement and biological significance of the volatile sulfur compounds hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide in various biological matrices. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009 Oct 15;877(28):3366-77.
- Zhang, Z. Yang, M. Pawliszyn, J. 1994. Solid-Phase Microextraction. Analytical Chemistry, Vol. 66, No. 17, September 1.



## LIITTEET

### Liite 1. Alfa-pineenistandardien valmistusohje

Rikkihiili on myrkyllistä ja voimakkaasti haihtuvaa. Lisäksi sen pipetointi on haastavaa liuoksen pienen viskositeetin vuoksi. Liuokset tulee valmistaa vetokaapissa erikoiskäsinein.

Punnitaan 200 mg alfa-pineeniä, joka liuotetaan rikkihiileen 100 ml:n mittapullossa.

$$c = \frac{m}{V} = \frac{200 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} = 2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 2000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

Saadusta liuoksesta valmistetaan 10 ml:n mittapulloihin laimennokset alla olevan taulukon mukaisesti.

Pitoisuus, $\mu\text{g/ml}$	Pipetoidaan 2 mg/l –liuosta, ml
2000	0
1500	7,5
1000	5
500	2,5
200	1
20	0,1

Esimerkkilasku:

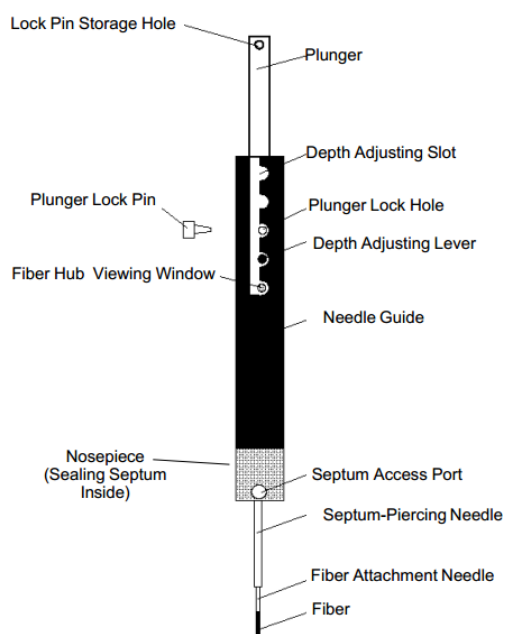
$$c_2 = \frac{c_1 V_1}{V_2} = \frac{2000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot 2,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 500 \mu\text{g/ml}$$

## Liite 2. Näytteenotto-ohje

Ennen näytteenottoa kaikki käytettävät SPME-kuidut tulee puhdistaa kaasukromatografian injektioportissa. Ohjekirjan mukaan Carboxen/PDMS –kuituja pidetään 300 °C portissa yksi tunti kantokaasun virratessa ohivirtausventtiilin ollessa auki.

- Kelloon säädetään haluttu näytteenottoaika
- SPME-kuidun neula painetaan esille ja lukitaan alimpaan syvyyteen
- Neula työnnetään septumin läpi näytteenottopulloon
- Kuidun lukitustappi poistetaan
- Mäntä painetaan pohjaan ja kello laitetaan käyntiin
- Kellon soidessa kuitu nostetaan ylös, neula vedetään ulos pullosta ja neula vedetään suojaan laitteen sisään
- Kuitu lukitaan tapilla

Kuidut hajoavat helposti, jos niitä käsittelee väärin. Kuitu on vedettävä aina suojaan neulan sisään ennen neulan nostamista septumista tai muutoin kuitu katkeaa.



### Liite 3. Näytteidenajo-ohje

Vaihdetaan injektoriin uusi septumi ja puhdas sisäputki. Likaiset sisäputket laitetaan likoamaan rikkihiileen. Lionnut putki kuivataan typpivirrassa, jonka jälkeen sitä voidaan käyttää. Laitetaan laite päälle, kaasut auki ja valitaan metodi. Standardeille on oma metodinsa, jossa injektointi on säädetty autosamplerille. Muista laittaa liekki päälle.

Standardit (injektointi autosamplerilla):

- pesupulloihin rikkihiiltä
- ruisku pestään rikkihiilellä
- Luodaan sekvenssi määritettävien näytteiden mukaan
- Ajo

SPME-kuidut (injektointi käsin):

- Painetaan start run ja laite tasaa olosuhteita kaksi minuuttia
- sitten tulee pre-run, joka kestää puolitoistaminuuttia
- Kun pre-run päättyy, neula työnnetään injektoriin. Huom. välillä neula ei meinaa sujahtaa ohueen sisäputkeen. Kun neula on sisäputkessa, painetaan kuitu esiin. Ajo alkaa välittömästi pre-runin jälkeen.
- Ajon jälkeen kuitu vedetään ensin neulaan ja neula poistetaan vasta sitten septumista.
- Käytetty kuitu tulee puhdistaa ennen seuraavaa näytteenottoa.